

UDK 615.33:579.84  
579.61

# Utjecaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom

## Factors affecting the antimicrobial susceptibility testing of bacteria by disc diffusion method

Marina Bubonja<sup>1\*</sup>, Maja Mesarić<sup>1</sup>, Ante Miše<sup>1</sup>, Marina Jakovac<sup>1</sup>, Maja Abram<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Primljeno: 22. 7. 2008.  
Prihvaćeno: 10. 10. 2008.

Adresa za dopisivanje:

\* Dr. sc. Marina Bubonja, dr. med.,  
Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju,  
Medicinski fakultet Rijeka,  
Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka  
tel. +385 51 651 172  
e-mail: mbubonja@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

**SAŽETAK. Cilj:** Disk difuzijska metoda određivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike zbog jednostavnosti izvedbe rutinski se primjenjuje u većini kliničkih mikrobioloških laboratorija. Na europskom području primjenjuje se, međutim, više različitih nacionalnih standarda za interpretaciju rezultata testiranja antimikrobne osjetljivosti. Ispitano je kako promjena fizikalnih uvjeta testiranja, kao i tumačenje dobivenih rezultata prema standardima američkog *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* ili britanskog *British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)* utječu na ishod testiranja osjetljivosti bakterija na antibiotike. **Metode:** Antimikrobna osjetljivost kliničkih izolata te kontrolnih ATCC bakterijskih sojeva poznate osjetljivosti na antibiotike ispitana je metodom disk difuzije pri različitim pH vrijednostima hranjive podloge, različitoj gustoći bakterijskog inokuluma te uz promjenu temperature i duljine inkubacije. **Rezultati:** Značajno odstupanje u veličini zona inhibicije te posljedično i tumačenje rezultata osjetljivosti uočeno je kod bakterije *Stenotrophomonas maltophilia* (osjetljivost na kotrimoksazol pri promjeni temperature i duljine inkubacije). Promjena gustoće inokuluma kao i pH vrijednosti podloge dovela je do promjene u veličini zona inhibicije svih ispitivanih antibiotika testiranih ATCC sojeva. Ističe se izrazita podložnost aminoglikozidnih antibiotika promjenama pH vrijednosti, što ima za posljedicu smanjenu osjetljivost bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* na antibiotike iz ove skupine. **Rasprava i zaključak:** Rezultati dobiveni disk difuzijskom metodom ne ovise samo o održavanju visoko standardiziranih postupaka tijekom izvođenja, nego i o odabranom nacionalnom standardu za testiranje osjetljivosti. Redovitim kontrolom kvalitete izvođenja antibiograma mogu se uočiti i ispraviti pogreške u svakodnevnom radu te na taj način osigurati vjerodostojnost rezultata izdanih u kliničke svrhe. Usklađivanje nacionalnih standarda pridonijet će kvalitetnijoj usporedbi rezultata europskih kao i svjetskih laboratorija.

**Ključne riječi:** bakterije, disk difuzija, određivanje antimikrobne osjetljivosti

**ABSTRACT. Aim:** The disc diffusion technique is used routinely for antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing bacteria. However, in different European countries various national standards for antimicrobial testing are used to determine bacterial susceptibility. The aim of this study was to determine the influence of different conditions, as well as interpretation of results according to *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* or *British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)* on antimicrobial susceptibility testing. **Methods:** Antimicrobial susceptibility of clinical isolates and quality control ATCC was tested by disc diffusion technique using different temperatures, incubation period, pH of agar medium and the size of bacterial inoculum. **Results:** The great variations in the inhibition zone diameters and consequently in the interpretation of results were noticed in the case of *Stenotrophomonas maltophilia*. Cotrimoxazole susceptibility results varied significantly depending on standard applied. Inoculum density and alteration in pH value of the testing medium had effect on zone inhibition diameters of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* ATCC strains. The antibacterial activity of all examined antibiotics was affected by the alteration of acidity of the testing medium but aminoglycosides were the most affected by different pH. **Discussion and conclusions:** The results of susceptibility testing depend on performance of standardized disc diffusion test method as well as on applied standards and protocols. Continuous quality control is essential in the recognition, resolution and avoidance of errors in used method. In addition, the harmonisation of national standards for antimicrobial susceptibility testing should aid detection and comparison of antibiotic resistance in Europe and elsewhere.

**Key words:** antimicrobial susceptibility testing, bacteria, disk diffusion method

## UVOD

Zbog svoje se jednostavnosti već dugi niz godina disk difuzijska metoda rutinski koristi za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike. Postupak poznat i kao Kirby-Bauerov test inačica je postupka koji su prije četrdeset godina opisali Bauer, Kirby, Sherris i Turck<sup>1</sup>. Ova je metoda ne samo jeftina i jednostavna za izradu, nego i relativno brzo daje potrebne podatke (18-24h nakon izolacije i identifikacije bakterija), te omogućuje ispitivanje osjetljivosti bakterije na više antibiotika istovremeno. Difuzijski se postupak izvodi u Petrijevoj zdjelici na čvrstoj hranjivoj podlozi određenog sastava – Mueller-Hintonov agar (MHA) sa ili bez dodatka ovčje krvi. Diskovi natopljeni antibiotikom stavljaju se na površinu hranilišta koja je prethodno naciepljena čistom bakterijskom kulturom. Budući da debljina i sastav hranjive podloge mogu utjecati na rezultate, postupak se izvodi u skladu s načelima koja ujednačuju metodologiju izvođenja. Nakon inkubacije mjeri se promjer zone inhibicije rasta bakterija, te se prema standardu, u Hrvatskoj CLSI dokument, ispitivani soj svrstava u kategorije osjetljiv, umjereno osjetljiv i otporan<sup>2</sup>.

Budući da različiti čimbenici mogu utjecati na rezultate ispitivanja osjetljivosti bakterije na antibiotike, tijekom postupka svi parametri moraju biti konstantni. Veličina zone inhibicije jedina je promjenjiva varijabla, a na osnovi dobivenih rezultata odabire se najdjelotvorniji antibiotik. Tako se u svakodnevnom radu laboratorija, zbog neradnih vikenda ili blagdana, susrećemo s odstupanjem u preporučenoj duljini inkubacije antibiograma, a nedostatak ili neispravnost odgovarajuće laboratorijske opreme također može značajno utjecati na ishod dobivenih rezultata. Poznato je, naime, da antibakterijska aktivnost testiranog antibiotika ovisi o brojnim čimbenicima kao što su temperatura i vrijeme inkubacije, izbor hranjive podloge, pH vrijednost podloge, starost i način skladištenja antibiotika itd.<sup>2</sup> Dodatno, u različitim se europskim zemljama koriste različiti nacionalni standardi za testiranje osjetljivosti bakterijskih izolata. Iz svega navedenog slijedi da interpretacija rezultata testiranja osjetljivosti ovisi kako o izvedbi standardizirane metode tako i o primijenjenim standardima i protokolima.

## MATERIJALI I METODE

Antimikrobna osjetljivost kliničkih izolata bakterije *Stenotrophomonas maltophilia* te kontrolnih sojeva (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) na različite antibiotike ispitana je disk difuzijskom metodom. Suspenzija ispitivanog soja bakterija nanosena je na MHA (Oxoid, Engleska) te su na površinu agara postavljeni diskovi natopljeni standardiziranom količinom antibiotika: tetraciklin, 30; ciprofloksacin, 5; norfloksa-

Odstupanje od standardnih preporuka za izradu disk difuzijskog antibiograma (odgovarajuća temperatura i duljina inkubacije, gustoća bakterijskog inokuluma, pH vrijednost hranilišta) ima za posljedicu značajne promjene veličina zona inhibicije, što utječe na interpretaciju antimikrobne osjetljivosti testiranih bakterijskih sojeva.

cin, 5; eritromicin, 15; kotrimoksazol, 1,23/23,75; gentamicin, 10; amikacin, 30 i azitromicin, 15 (koncentracije navedene u mikrogramima), (Oxoid, Engleska). Vrijednost pH podloge prethodno je podešena na 5; 6; 7,3; 8 i 9. Gustoća korištenog bakterijskog inokuluma bila je  $10^6$ ,  $10^8$  i  $10^{10}$  CFU (jedinica koja formira koloniju; od engl. *colony forming unit*). Broj bakterija u inokulumu određen je naciepljivanjem serijskih razrjeđenja bakterijske suspenzije na hranjivu podlogu te brojenjem poraslih kolonija nakon prekonoćne inkubacije pri 37°C. Ispitivanje osjetljivosti kontrolnih ATCC sojeva izvedeno je prema CLSI standardu<sup>3,4</sup>, a testiranje osjetljivosti *S. maltophilia* prema CLSI i BSAC dokumentima<sup>5</sup>. Inokulirane podloge stavljene su na inkubaciju na 35 do 37°C, a *S. maltophilia* na 35-37°C i 30°C. Nakon 24h (kao i nakon 18h u slučaju *S. maltophilia*) ploče su pregledane i vrijednosti očitane.

## REZULTATI

Zone inhibicije za *S. maltophilia* dobivene disk difuzijskom metodom izvedenom prema BSAC (18h/30°C) ili CLSI preporukama (20-24h/35 ± 2°C) značajno se razlikuju (tablica 1). Izolat osjetljiv na

kotrimoksazol prema BSAC standardima pokazao se otpornim prema CLSI standardima kojima se preporuča dulja inkubacija na višoj temperaturi. Iz tablice 2 vidljivo je da odstupanje od preporučene gustoće inokuluma korištenih bakterija, koja iznosi  $10^8$  CFU, utječe na veličinu promjera zone inhibicije oba ispitivana kinolonska antibiotika. Veličine zone inhibicije smanjuju se s povećanjem bakterijskog inokuluma. Jedino u slučaju ispitivanja osjetljivosti kontrolnog ATCC soja bakterije *S. aureus* na ciprofloksacin, međutim, dolazi do

Promjene u uvjetima izrade disk difuzijskog antibiograma znatno utječu na veličinu zona inhibicije aminoglikozidnih antibiotika, ne odražavajući se znatnije na rezultate testiranja kinolonskih antibiotika. Testiranje osjetljivosti bakterije *Stenotrophomonas maltophilia* na kotrimoksazol prema BSAC i CLSI standardima daje različite rezultate.

značajne promjene veličine zone što ima za posljedicu i promjenu u tumačenju antimikrobne osjetljivosti ove bakterije.

Promjene pH vrijednosti MHA utjecale su na veličinu zona inhibicije rasta i to u većoj mjeri kod testiranja bakterija *S. aureus* i *E. coli*, a manje u slučaju *P. aeruginosa* (tablica 3). S porastom pH vrijednosti hranilišta povećavale su se i veličine zona inhibicije kod svih ispitivanih antibiotika izuzev tetraciklina, kod kojeg je pri porastu pH vrijednosti došlo do smanjenja zona inhibicije. Od svih testiranih antibiotika kinoloni su najmanje pogođeni promjenom pH. Odstupanja od vrijednosti

**Tablica 1.** Utjecaj duljine inkubacije i temperature na vrijednost promjera zone inhibicije (mm) odabranih antibiotika na *Stenotrophomonas maltophilia*

**Table 1.** Effect of incubation time and temperature on antimicrobial activity of selected antibiotics against *Stenotrophomonas maltophilia*, expressed as inhibition zone (mm)

Antibiotik	Duljina / temperatura inkubacije	
	(18h/30°C)	(24h/37°C)
tetraciklin	8 (R)	0 (R)
ciprofloksacin	15 (R)	14 (R)
kotrimoksazol	30 (S)	7 (R)

S = osjetljiv, R = otporan

zadanih za kontrolne ATCC bakterijske sojeve CLSI priručnikom bila su izraženija kod krajnjih vrijednosti pH za sve antibiotike. Izražene promjene veličine zona inhibicije bakterija *E. coli* i *S. aureus* na aminoglikozidne antibiotike pri krajnjim vrijednostima pH vrijednosti podloge rezultirale su drugačijim tumačenjem osjetljivosti ovih bakterija (osjetljive bakterije postaju umjereno osjetljive). Isto se može uočiti u slučaju ispitivanja osjetljivosti svih sojeva na tetraciklin, te osjetljivosti *S. aureus* na azitromicin.

## RASPRAVA

Brzina bakterijskog rasta, kao i preživljavanje bakterije u hranjivom mediju, između ostalog ovise o različitim fizikalnim i kemijskim čimbenicima iz okoline, što može izravno utjecati i na rezultate ispitivanja antimikrobne osjetljivosti bakterija. Primjena standardiziranih postupaka u svakodnevnom radu kliničkih mikrobioloških laboratorija osigurava jednake uvjete i vjerodostojnost dobivenih rezultata.

Ispitivanjem antimikrobne osjetljivosti kontrolnih ATCC sojeva brzorastućih bakterija poznate osjetljivosti na antibiotike pokazali smo da odstupanje od standardnih preporuka dovodi do značajnih promjena u veličini zona inhibicije te u nekim slučajevima i do drugačijeg tumačenja rezultata. Odstupanje od preporučene neutralne pH vrijednosti MHA rezultira djelomičnom inaktivacijom pojedinih antibiotika, što ima za posljedicu prividno smanjenje osjetljivosti ispitivanih sojeva. Dobiveni se rezultati uglavnom podudaraju s podacima iz literature koji kažu da pri nižim pH vrijednostima hranjivog medija aminoglikozidi, kinoloni i makrolidi gube djelotvornost, dok se djelotvornost tetraciklina povećava. Povišenje pH djeluje obrnuto, pa povećava učinak aminoglikozida, makrolida i kinolona, a smanjuje učinak tetraciklina<sup>3</sup>.

Istražujući i uspoređujući rezultate standardiziranog i nestandardiziranog ispitivanja antimikrobne osjetljivosti bakterije *E. coli*, skupina istraživača ustanovila je da inkubacija pripremljenih antibiograma na 35 ili 40°C nema značajniji utjecaj na dobivene rezultate, no istom studijom pokazano je da anaerobna atmosfera ili promjena bakterijskog inokuluma znatno mijenja ishod testiranja<sup>6</sup>. Naša je studija pokazala da je ishod ispitivanja antimikrobne osjetljivosti kliničkog izolata

**Tablica 2.** Utjecaj bakterijskog inokuluma na veličinu promjera zone inhibicije (mm) odabranih kinolona prema ATCC sojevima bakterija za kontrolu kvalitete antibiograma**Table 2.** Effect of inoculum on antimicrobial activity of selected kinolones against ATCC reference strains, expressed as inhibition zone (mm)

Bakterija	Antibiotik	CLSI raspon za QC sojeve	Gustoća inokuluma (CFU/ml)		
			10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>10</sup>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CIP	22-30	25 (S)	22 (S)	18*(I)**
	NOR	17-28	24 (S)	20 (S)	18 (S)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CIP	30-40	33 (S)	30 (S)	26*(S)
	NOR	28-35	30 (S)	28 (S)	23*(S)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	CIP	25-33	37*(S)	30 (S)	23*(S)
	NOR	22-29	31*(S)	26 (S)	21*(S)

CFU=colony forming units, CLSI=Clinical and Laboratory Standards Institute, QC=quality control, I=umjereno osjetljiv, S=osjetljiv; R=otporan, CIP=ciprofloksacin, NOR=norfloksacin, \* vrijednost izvan raspona predviđenog CLSI standardom za kontrolne sojeve, \*\* promjena kategorije osjetljivosti

**Tablica 3.** Utjecaj pH vrijednosti hranilišta na veličinu promjera zone inhibicije (mm) odabranih antibiotika na ATCC sojeve za kontrolu kvalitete antibiograma**Table 3.** Effect of pH on antimicrobial activity of antibiotics against ATCC reference strains, expressed as inhibition zone (mm)

Bakterija	Antibiotik	CLSI raspon za QC sojeve	pH hranilišta				
			pH 5	pH 6	pH 7,3	pH 8	pH 9
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	GM	19-27	15*(S)	20 (S)	25 (S)	26 (S)	30*(S)
	AK	20-26	16*(I)**	22 (S)	25 (S)	25 (S)	25 (S)
	CIP	22-30	23 (S)	23 (S)	24 (S)	24 (S)	22 (S)
	NOR	17-28	20 (S)	23 (S)	20 (S)	20 (S)	20 (S)
	E	22-30	14*(I)**	23 (S)	28 (S)	28 (S)	>30*(S)
	TE	24-30	>30*(S)	25 (S)	24 (S)	20 (S)	17*(I)**
	AZM	21-26	0*(R)**	17*(I)**	26 (S)	>30*(S)	>30*(S)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	GM	19-26	14*(I)**	16*(S)	24 (S)	27*(S)	28*(S)
	AK	19-26	15*(I)**	17*(S)	24 (S)	25 (S)	28*(S)
	CIP	30-40	25*(S)	25*(S)	>30 (S)	>30 (S)	>30 (S)
	NOR	28-35	24*(S)	26*(S)	>30 (S)	>30 (S)	>30 (S)
	TE	18-25	23 (S)	20 (S)	19 (S)	16*(I)**	15*(I)**
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	GM	16-21	16 (S)	18 (S)	21 (S)	20 (S)	20 (S)
	AK	18-26	22 (S)	22 (S)	24 (S)	24 (S)	23 (S)
	CIP	25-33	20*(I)**	30 (S)	30 (S)	30 (S)	28 (S)
	NOR	22-29	12*(R)**	30 (S)	29 (S)	29 (S)	29 (S)
	TE	-	16*(I)**	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)

CLSI=Clinical and Laboratory Standards Institute, QC=quality control, S=osjetljiv; I=umjereno osjetljiv, R=otporan, CIP=ciprofloksacin, NOR=norfloksacin, TE=tetraciklin, E=eritromicin, SXT=kotrimoksazol, GM=gentamicin, AK=amikacin, AZM=azitromicin, \* vrijednost izvan raspona predviđenog CLSI standardom za kontrolne sojeve, \*\* promjena kategorije osjetljivosti

*S. maltophilia* na kotrimoksazol izrazito ovisan o temperaturi i vremenu uzgoja. Pored toga što je liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *S. maltophilia* problematično zbog njene intrinzične rezistencije na mnoge antibiotike, ono je dodatno otežano poteškoćama koje proizlaze iz metodoloških problema rutinskog testiranja njene antimikrobne osjetljivosti. Preporuke britanskih i američkih standardnih dokumenata za ispitivanje osjetljivosti bakterije *S. maltophilia* na antibiotike ne razlikuju se samo u preporučenoj temperaturi, već i u duljini inkubacije. Nedostatak standardiziranih testova i njihovih interpretativnih kriterija za testiranje osjetljivosti bakterije *S. maltophilia* izrazito otežava izbor odgovarajućeg antibiotika. Neophodne su daljnje studije kako bi se poboljšalo *in vitro* testiranje osjetljivosti ove bakterije i utvrdila optimalna temperatura i duljina inkubacije antibiograma koja će dati rezultate u skladu sa stvarnim *in vivo* učinkom antibiotika. Vrijednost bakterijskog inokuluma u svakodnevnom se radu često određuje golim okom na osnovu zamućenja medija. Nepreciznost ove metode dovodi do odstupanja od preporučenih vrijednosti. Pokazali smo da, iako s povećanjem broja bakterija u inokulumu dolazi do smanjenja zona inhibicije kinolonskih antibiotika, ove promjene ne utječu na interpretaciju rezultata. Ovo se može objasniti stabilnošću kinolonskih antibiotika, ali i velikim rasponom njihovih zona inhibicije, pa se manje promjene u veličini zone ne odražavaju značajno na tumačenje osjetljivosti bakterije na pojedini kinolonski antibiotik. Za razliku od kinolona, aminoglikozidni antibiotici imaju manje zone inhibicije pa svako dodatno smanjenje brže rezultira promjenom u tumačenju osjetljivosti ispitivanog bakterijskog soja. Tako je jedna studija pokazala da korištenje nove zalihe hranjive podloge može utjecati na rezultate testiranja osjetljivosti bakterije *P. aeruginosa* na aminoglikozidne antibiotike<sup>7</sup>. Ovo se može objasniti i varijacijom u sastavu podloge jer je utvrđeno da bakterija postaje otpornija na antibiotik ukoliko se povećava sadržaj kationa u agaru<sup>8</sup>. Značajnije promjene u rezultatima ispitivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike nastale uslijed nestandardiziranog izvođenja testova mogu rezultirati pogrešnim izborom antibiotika za liječenje infekcije. Trajna kontrola kvalitete je nužna u pre-

poznavanju, rješavanju i izbjegavanju grešaka u svakodnevnom laboratorijskom radu. Kontinuirana unutarnja i vanjska kontrola rada mikrobioloških laboratorija osigurat će točnost rezultata testiranja antimikrobne osjetljivosti<sup>9,10</sup>.

Usklađivanje nacionalnih i donošenje jedinstvenog europskog standarda za testiranje osjetljivosti trebalo bi također pomoći u detekciji i usporedbi antibiotske rezistencije u Europi i šire<sup>11</sup>.

## LITERATURA

1. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:493-6.
2. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disc diffusion methods. In: Murray PR, Baron E J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White
3. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: 9th informational supplement M2-A9. Wayne, PA: CLSI, 2006.
4. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: 17th informational supplement M100-S17. Wayne, PA: CLSI, 2007.
5. Andrews JM. BSAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *J Antimicrob Chemother* 2008;62:256-78.
6. Ring DL, Flournoy DJ. Antimicrobial susceptibility testing of pathogenic *Escherichia coli* using non-standard conditions. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1984;6:139-42.
7. Pollock HM, Minshew BH, Kenny MA, Schoenknecht FD. Effect of different lots of Mueller-Hinton agar on the interpretation of the gentamicin susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:360-7.
8. Kenny MA, Pollock HM, Minshew BH, Casillas E, Schoenknecht FD. Cation components of Mueller-Hinton agar affecting testing of *P. aeruginosa* susceptibility to gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17:55-62.
9. Bronzwaer S, Buchholz U, Courvalin P, Snell J, Cornaglia G, De Neeling A et al; EARSS participants. Comparability of antimicrobial susceptibility test results from 22 European countries and Israel: an external quality assurance exercise of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) in collaboration with the United Kingdom National External Quality Assurance Scheme (UK NEQAS). *J Antimicrob Chemother* 2002;50:953-64.
10. Chaitram JM, Jevitt LA, Lary S, Tenover FC; WHO Antimicrobial Resistance Group. The World Health Organization's External Quality Assurance System Proficiency Testing Program has improved the accuracy of antimicrobial susceptibility testing and reporting among participating laboratories using NCCLS methods. *J Clin Microbiol* 2003;41:2372-7.
11. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Odenholt I et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:501-3.



UDK 579.67  
616.33-002-078  
078

# Ispitivanje virulencije različitih sojeva kampilobaktera u mišjem modelu

## Comparative virulence of four different *Campylobacter* strains in a mouse model

Darinka Vučković<sup>\*1</sup>, Maja Abram<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zavod za mikrobiologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

**SAŽETAK. Cilj:** Bakterije roda *Campylobacter* najčešći su uzročnici bakterijskog gastroenteritisa u ljudi širom svijeta. Najčešćim izvorom infekcije ljudi s *C. jejuni* i *C. coli* smatra se pileće meso. Dijelom i zbog nedostatka odgovarajućeg životinjskog modela za *in vivo* istraživanja, još uvijek nije objašnjeno jesu li svi izolati iz namirnica virulentni i mogu li izazvati infekciju u čovjeka. Cilj našeg istraživanja bio je utvrditi razliku u virulenciji između sojeva kampilobaktera različitog podrijetla koristeći prethodno uspostavljeni model miše kampilobakterioze. **Metode:** BALB/c miševi intravenski su inficirani različitim sojevima kampilobaktera. Ispitana su tri soja *C. jejuni* (dva klinička izolata i jedan izolat iz pilećeg mesa) i jedan *C. coli* (klinički izolat). Broj bakterija u homogenatima organa (jetre i slezene) praćen je osam dana. **Rezultati:** Nakon inokulacije, bez obzira na ispitivani soj, uspostavljena je sustavna infekcija koja je potvrđena izolacijom bakterija iz jetre i slezene. S obzirom na razlike u broju izoliranih kampilobaktera iz homogenata ispitivanih organa, zapažena je razlika u virulenciji ispitivanih sojeva. Najveći broj bakterija dokazan je u jetri i slezeni životinja inficiranih *C. jejuni* izolatima iz pilećeg mesa, dok je *C. coli* pokazao najslabiju virulenciju. **Zaključci:** Bakterije roda *Campylobacter* pokazuju razlike u virulenciji ovisno o vrsti i podrijetlu izolata. U opisanom mišjem modelu virulencija je najsnažnije izražena u slučaju *C. jejuni* izolata iz namirnica, upućujući na značajnost pilećeg mesa u uspostavi humane kampilobakterioze.

**Glavne riječi:** kampilobakteri, klinički izolat, miševi, pilećina, virulencija

**SUMMARY. Aim:** *Campylobacter* spp. is recognized as the most common bacterial cause of human gastroenteritis worldwide. Poultry meat is considered to be a major source of *C. jejuni* and *C. coli*. However, partly due to the lack of appropriate animal model of infection, it is still not clear whether all of food isolates are virulent and can cause disease in humans. The aim of this study was to affirm possible virulence differences of *Campylobacter* spp. from different origin in a previously established mouse model. **Methods:** BALB/c mice were intravenously infected with four different *Campylobacter* strains. Three different strains of *C. jejuni* (two isolates recovered from diarrhoeal patients and one poultry derived isolate), and one *C. coli* (human clinical isolate) were tested. Infected mice were sacrificed at different time points and the number of recovered bacteria (CFU/organ) in the organ homogenates (spleen and liver) was determined. **Result:** The isolates were differentially virulent for mice according to different numbers of bacteria recovered from the examined organs. The highest numbers of bacteria were recovered from livers and spleens of animals infected with food isolate of *C. jejuni*. *C. coli* showed the least virulence potential. **Conclusions:** *Campylobacter* spp., a major human enteric pathogen, exhibits significant strain-to-strain differences in pathogenic potential in a mouse model. Mouse virulence of tested strains showed a trend toward food isolate indicating chicken meat associated risk of campylobacteriosis.

**Key words:** campylobacters, clinical isolate, food isolate, mice, virulence

Primljeno: 18. 7. 2008.

Prihvaćeno: 25. 9. 2008.

Adresa za dopisivanje:

<sup>\*</sup> Darinka Vučković,  
Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,  
Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka  
tel. +385 51 651 172; faks: +385 51 651 177  
e-mail: dara@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Kampilobakteri, gram-negativni zavijeni štapići, normalni su stanovnici probavnog sustava toplokrvnih životinja i ptica. Ima ih više od 17 vrsta, a u humanoj patologiji najznačajniji su *Campylobacter jejuni* koje se može naći i u peradi, mačaka, pasa i glodavaca, te *C. coli* koji se izolira pretežno iz svinja<sup>1,2</sup>. Ove su vrste, a posebno *C. jejuni*, danas prepoznate kao vodeći uzročnici bakterijskog gastroenteritisa u zemljama u razvoju i razvijenim zemljama.

Kampilobakteri, posebno *C. jejuni* i *C. coli*, danas su vodeći uzročnici bakterijskog gastroenteritisa u zemljama u razvoju i razvijenim zemljama. Glavnim izvorom infekcije u ljudi smatra se nedovoljno termički obrađeno pileće meso, no još uvijek nije poznato jesu li svi sojevi izolirani iz mesa peradi sposobni izazvati infekciju.

ma i izoliraju se znatno češće od ostalih crijevnih patogena, salmonela i šigela<sup>3</sup>. Poznat je cijeli niz činitelja virulencije kampilobaktera. Jedan od najranije upoznatih je bič, flagela, koja ima važnu ulogu u kolonizaciji sluznice probavnog sustava<sup>4,5</sup>. Dokazano je također da neke tvari, kao što su žuč ili mucin, djeluju kao kemoatraktanti za kampilobaktere, što olakšava naseljavanje u probavnom sustavu i žučnom mjehuru životinja, a vjerojatno i ljudi<sup>6</sup>. Kampilobakteri također mogu proizvoditi i niz toksina od kojih je najpoznatiji citoletalni toksin (engl. *cytolethal distending toxin*, CDT), zatim vero toksin, shiga-like toksin, hepatotoksin itd., međutim njihova uloga u patogenezi nije sasvim razjašnjena<sup>7-9</sup>.

Zbog velike prevalencije *C. jejuni* u peradi, nedovoljno termički obrađeno pileće meso ili križna kontaminacija druge hrane smatra se glavnim izvorom infekcije u ljudi. Izvor infekcije može biti i meso drugih domaćih životinja, naročito svinja, ali i nepasterizirano mlijeko, voda i druge namirnice zagađene ekskretima inficiranih životinja te izravni kontakt s inficiranim životinjama (profesionalno ili s kućnim ljubimcima)<sup>10</sup>. Prema podacima laboratorija za kontrolu hrane u Hrvatskoj, tijekom 2005. utvrđeno je tri posto uzoraka hrane životinjskog podrijetla kontaminirane kampilobakterom<sup>11</sup>.

Iako je uočena veza između konzumacije kontaminiranog pilećeg mesa i kampilobakterioze u ljudi, još uvijek nije poznato jesu li svi sojevi izolirani iz mesa peradi sposobni izazvati infekciju u čovjeka. Nedostatak pogodnog životinjskog modela za istraživanje virulencije kampilobaktera *in vivo* otežava izučavanje patogeneze kampilobakterioze, stoga smo odlučili usporediti virulenciju nekoliko sojeva kampilobaktera različitog podrijetla na prethodno uspostavljenom eksperimentalnom mišjem modelu sustavne kampilobakterioze koji se pokazao visoko reproducibilnim i pogodnim za istraživanje patogeneze ove bolesti<sup>12</sup>.

## MATERIJAL I METODE

**Pokusne životinje.** U radu su korišteni BALB/c (H-2d) miševi, ženke starosti 8 – 10 tjedana. Miševi su uzgojeni u uzgojnoj koloniji Medicinskog fakulteta u Rijeci, a hranjeni su hranom za laboratorijske mišve (Diete M Standard, Mucedola s. r. l., Italija).

**Bakterijski sojevi.** Ispitana su dva klinička izolata *C. jejuni* (A i B) izolirana iz stolice bolesnika s izraženim enteralnim simptomima, jedan izolat *C. jejuni* (C) izoliran iz namirnice (pileće meso) te jedan klinički izolat *C. coli* iz stolice bolesnika s proljevom. Bakterijski sojevi su do upotrebe zamrznuti u moždano srčanom bujonu (BHI od engl. *brain heart infusion*) (Difco, Detroit, SAD) uz 15% (v/v) glicerola na -80°C. Inokulum je pripreman odleđivanjem bakterija te presađivanjem na krvni agar s dodatkom 5% ovčje krvi. Nakon inkubacije od 48 sati u mikroaerofilnim uvjetima (CampyPak vrećice, Becton Dickinson, Maryland, SAD) i pri temperaturi od 42°C radila se svježa suspenzija za inokulaciju. Miševi su inficirani intravenski (i.v.) dozom od  $2.5 - 5 \times 10^8$  bakterijskih stanica (CFU od engl. *colony forming unit*) po životinji u volumenu 0,2 ml BHI. Broj bakterija u suspenziji određivan je spektrofotometrijski, a potvrđen nasađivanjem serijskih desetorostrukih razrjeđenja na krvni agar s dodatkom 5% ovčje krvi.

**Određivanje broja kampilobaktera u organima.** Broj bakterija u homogenatima tkiva/organa praćen je tijekom osam dana. Nakon žrtvovanja aseptički su odstranjene jetra i slezena. Svaki organ je propasiran u 5 ml sterilne puferirane fiziološke otopine (PBS od engl. *phosphate buffered saline*). Homogenati organa su zatim centrifugirani na

1300g kroz 5 minuta, supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u 5ml destilirane vode i ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi. Bakterije su zatim isprane u fiziološkoj otopini te resuspendirane u 5ml BHI bujona. Broj bakterijskih stanica određen je nasađivanjem serijskih desetostrukih razrjeđenja homogenata organa na krvni agar s 5% ovčje krvi nakon inkubacije od 48 sati u mikroaerofilnim uvjetima.

**Statistička obrada.** Razlike između pojedinih parova bakterija određivane su pomoću Mann-Whitney testa. Razina statističke značajnosti postavljena je na 95% ( $p < 0,05$ ).

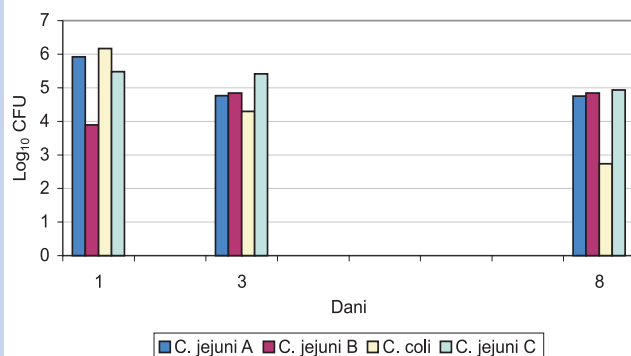
## REZULTATI

BALB/c miševi su intravenski (i.v.) inficirani različitim sojevima kampilobaktera. Infekcija je praćena osam dana, a miševi su žrtvovani prvi, treći i osmi dan nakon inokulacije. Tijekom promatranog razdoblja niti jedna životinja nije uginula. Uspostava sustavne infekcije potvrđena je izolacijom kampilobaktera iz jetre i slezene inficiranih miševa.

Najveći broj bakterija iz tkiva jetre (slika 1) izoliran je prvi dan nakon infekcije kliničkim izolatima

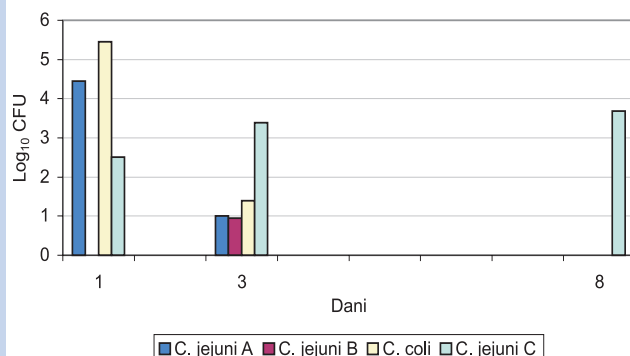
*C. coli*. Broj je bio statistički značajno veći nego u slučaju infekcije kliničkim izolatima *C. jejuni* A ( $p=0,024$ ) i B ( $p=0,036$ ), dok se statistički značajna razlika nije mogla uočiti kod infekcije izolatima iz pilećeg mesa. Treći dan po infekciji nema statistički značajne razlike u broju bakterija izoliranih iz jetre, bez obzira na soj kojim je infekcija izazvana. Osmog dana po infekciji još uvijek nije došlo do sterilnog iščišćavanja bakterija iz jetre eksperimentalnih miševa. Ipak, izolirano je značajno manje bakterija iz jetre životinja inficiranih *C. coli* u slučajevima infekcije kliničkim izolatima *C. jejuni* (soj A  $p=0,014$  i soj B  $p=0,034$ ).

Usporedba virulencije nekoliko sojeva kampilobaktera različitog podrijetla na eksperimentalnom mišjem modelu sustavne kampilobakterioze pokazala je razlike u virulenciji ovisno o vrsti i podrijetlu korištenog bakterijskog soja. Virulencija je bila najsnažnije izražena u slučaju *C. jejuni* izolata iz namirnice, ukazujući na značaj pilećeg mesa u uspostavi kampilobakterioze.



**Slika 1.** Broj kampilobaktera u jetri BALB/c miševa. Životinje su inficirane intravenski s  $2.5 - 5 \times 10^8$  CFU kampilobaktera različitog podrijetla. Ispitivani su klinički izolati *C. jejuni* A (■), *C. jejuni* B (■), *C. coli* (■) i *C. jejuni* C (■) izolat iz namirnice. U različitim vremenskim razmacima miševi su žrtvovani i određen je broj bakterija u jetri. Rezultati su prikazani kao medijane vrijednosti grupe 3 – 5 miševa i izraženi su kao  $\log_{10}$  CFU po organu.

**Figure 1.** Growth curve of *C. jejuni* in the liver of BALB/c mice. The animals were infected intravenously with  $2.5 - 5 \times 10^8$  CFU campylobacters from different origin. *C. jejuni* A (■), *C. jejuni* B (■) and *C. coli* (■) were clinical isolates and *C. jejuni* C (■) was food isolate. Mice were sacrificed at different time points and the number of bacteria in the liver was determined. The results are presented as the median values of bacteria recovered from groups of 3 – 5 mice and expressed as  $\log_{10}$  CFU per organ.



**Slika 2.** Broj kampilobaktera u slezeni BALB/c miševa. Životinje su inficirane intravenski s  $2.5 - 5 \times 10^8$  CFU kampilobaktera različitog podrijetla, klinički izolati *C. jejuni* A (■), *C. jejuni* B (■), *C. coli* (■) i *C. jejuni* C (■) izolat iz namirnice. U različitim vremenskim razmacima miševi su žrtvovani i određen je broj bakterija u slezeni. Rezultati su prikazani kao medijane vrijednosti grupe 3 – 5 miševa i izraženi su kao  $\log_{10}$  CFU po organu.

**Figure 2.** Growth curve of *C. jejuni* in the spleen of BALB/c mice. The animals were infected intravenously with  $2.5 - 5 \times 10^8$  CFU campylobacters from different origin. *C. jejuni* A (■), *C. jejuni* B (■) and *C. coli* (■) were clinical isolates and *C. jejuni* C (■) was food isolate. Mice were sacrificed at different time points and the number of bacteria in the spleen was determined. The results are presented as the median values of bacteria recovered from groups of 3 – 5 mice and expressed as  $\log_{10}$  CFU per organ.



Prateći broj bakterija u slezeni (slika 2) zamijetili smo da je početni broj izoliranih kampilobaktera prvog dana po infekciji bio najmanji u slučaju infekcije s *C. jejuni* B u usporedbi s *C. jejuni* A ( $p=0,007$ ), *C. coli* ( $p=0,017$ ) i *C. jejuni* pilećim izolatom ( $p=0,033$ ). Do kraja eksperimentalnog razdoblja u slezeni je došlo do potpunog iščišćavanja svih kliničkih izolata kampilobaktera. Za razliku od njih, broj CFU *C. jejuni* C izolata iz namirnice osmog se dana po infekciji u slezeni čak povećava, te je broj bio značajno veći u usporedbi s brojem *C. jejuni* A ( $p=0,044$ ) i *C. coli* ( $p=0,049$ ).

#### RASPRAVA

Gastroenteritis uzrokovan kampilobakterima jedna je od najčešćih akutnih dijarealnih bolesti svugdje u svijetu. Budući da je poznato da je infektivna doza potrebna za izazivanje bolesti različita, a isto tako varira i težina kliničke slike, od blagih proljeva do učestalih krvavo sluzavih stolica s lošim općim stanjem bolesnika, jasno je da patogenost kampilobaktera ovisi o cijelom nizu čimbenika od strane bakterije, ali i domaćina. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi izazivaju li različiti izolati kampilobaktera sustavnu infekciju u miša, te postoje li razlike u virulenciji ispitivanih sojeva, s obzirom na broj bakterija izoliranih iz jetre i slezene inficiranih životinja. Nakon intravenuske infekcije postignuta je diseminacija bakterija u jetru i slezenu. Tijekom osam dana trajanja eksperimenta, broj izoliranih bakterija i kinetika iščišćavanja iz analiziranih organa razlikovali su se među ispitivanim bakterijskim sojevima. Kod svih ispitivanih sojeva kampilobaktera prvog dana po infekciji uočeno je značajno manje bakterija u jetri od početnog inokuluma, što se može objasniti aktivacijom nespecifičnih imunoloških mehanizama domaćina, posebice makrofaga, čiju smo izraženu aktivnost dokazali u ranijim istraživanjima<sup>13</sup>. Ovaj broj bakterija ostao je podjednak kod većine ispitivanih sojeva i nakon osam dana. Najviše je opao broj *C. coli* čija se virulencija u ovom pokusnom modelu pokazala najslabijom. Sterilno iščišćavanje bakterija postignuto je u slezeni u slučaju infekcije kliničkim izolatima kampilobaktera. Nasuprot tome, izolat *C. jejuni* C je i nakon osam dana izoliran u značajnom broju, upućujući na virulenciju izolata iz pilećeg mesa i

potencijalnu ulogu ove namirnice u humanoj kampilobakteriozi.

Naš se pokusni *in vivo* model pokazao vrlo dobrim za istraživanje razlika u virulenciji bakterijskih sojeva. Razlike su posebno uočljive i naglašene ukoliko se eksperimentalna sustavna infekcija i broj bakterija prate na razini slezene. Korišteni pokusni model primjenjiv je i za *in vivo* istraživanja patogeneze kampilobakterioze te praćenje imunološkog odgovora domaćina.

#### ZAHVALA

Rad je potpomognut sredstvima znanstveno-istraživačkog projekta broj 062-0621273-0949 koje je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

#### LITERATURA

1. Newell DG. The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human hosts and in the environment. *Int J Infect Dis* 2002;6:16-21.
2. Studahl A, Andersson Y. Risk factors for indigenous campylobacter infection: a Swedish case-control study. *Epidemiol Infect* 2000;125:269-75.
3. Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 2001;32:1201-6.
4. Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1269-73.
5. Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* 2007;15:456-61.
6. Hugdahl MB, Beery JT, Doyle MP. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1988;56:1560-6.
7. Abuoun M, Manning G, Cawthraw SA, Ridley A, Ahmed IH, Wassenaar TM et al. Cytolethal distending toxin (CDT)-negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infect Immun* 2005;73:3053-62.
8. Ge Z, Schauer DB, Fox JG. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol* 2008;10:1599-607.
9. Wassenaar TM. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:466-76.
10. Kapperud G, Espeland G, Wahl E, Walde A, Herikstad H, Gustavsen S et al. Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol* 2003;158:234-42.
11. Gross-Bošković A. EFSA – *Campylobacteriosis* Outran Salmonellosis! *HČJZ* 2007;3:58.
12. Vučković D, Abram M, Dorić M. Primary *Campylobacter jejuni* infection in different mice strains. *Microb Pathog* 1998;24:263-8.
13. Vučković D, Dorić M. Changes in macrophage function during chemotherapy. *Folia Biol (Praha)* 1997;43:33-8.